FISH 分析栽培高粱×拟高粱、甜高粱×拟高粱的染色体行为

谢莉[1, 2]，曾艳华[1]，韩永华[1, 3]

1 广西师范大学生命科学学院，桂林 541004 ；

2 广西柳州市妇幼保健院，柳州 545001；

3 中国农业大学国家玉米改良中心，北京 100193

摘要：采用荧光原位杂交技术对 45S rDNA在栽培高粱×拟高粱、甜高粱×拟高粱F_1的有丝分裂和减数分裂染色体进行定位研究。在有丝分裂中期染色体上 2 个杂种分别检测到 2 个杂交信号，在减数分裂粗线期、终变期、中期Ⅰ染色体上 45S rDNA位于一个二价体上，说明这两个杂种携带 45S rDNA的染色体为同源染色体。根据 45S rDNA位点随细胞减数分裂过程的位置变化，表明这两个杂种染色体配对行为正常，平均构型为 2n=2x=20（10Ⅱ），证明 45S rDNA可作为染色体的一个识别指标间接地观察细胞减数分裂过程染色体的变化行为。

关键词：栽培高粱；甜高粱；拟高粱；45S rDNA；荧光原位杂交

Analysis of the chromosomes of *S. bicolor* × *S. propinquum* and *S. dochna* × *S. propinquum* by FISH

XIE Li[1, 2]， ZENG Yan-Hua[1]， HAN Yong-Hua[1, 3]

1 *College of Life Science*， *Guangxi Normal University*， *Guilin* 541004， *China*;

2 *Maternal and Children's Health Care Hospital of Liuzhou City*， *Liuzhou* 545001， *China*;

3 *National Center of Corn Improvement*， *Agricultural University of China*， *Beijing* 100193， *China*

Abstract: By means of fluorescence *in situ* hybridization (FISH)， we located and analyzed the sites of the 45S rDNA on the F_1 hybrids of *S. bicolor* × *S. propinquum* and *S. dochna* × *S.propinquum*. Two signals of 45S rDNA were mapped on the mitotic metaphase chromosomes in the F_1 hybrids，respectively，and one signal was present on a bivalent during meiotic of synaptene，diakinesis， and metaphase I. We inferred that the two mitotic chromosomes carrying 45S rDNA were homologous pairs. Considering the signals of 45S rDNA location during meiotic process， chromosome pairing of these two F_1 hybrids was normal with an average pairing configuration of 2n=2x=20 (10 II). Our results indicated that 45S rDNA could provide a landmark for identification individual chromosome during meiosis indirectly.

Keywords： *S.bicolor*; *S. dochna*; *S. propinquum*; 45S rDNA; fluorescence *in situ* hybridization

---

收稿日期:2008－08－06；**修回日期**:2008－09－10

基金项目:广西省自然科学基金资助项目（编号：桂科基0448045）资助

作者简介：谢莉（1981- ），女，硕士，研究方向：分子遗传学。Tel:0772-2819293;E-mail:guilinxieli@163.com

通讯作者：韩永华(1974-)，女，副教授，博士，研究方向：分子遗传学。Tel:0773-5833710;E-mail:hanyh329@163.com

栽培高粱属于禾本科（Gramineae）高粱属（*Sorghum*）植物，是世界种植的第五大禾谷类作物，还是重要的饲料植物和酿造业原料，而且，抗旱、耐盐碱和瘠薄土壤。de Wet和Huckabay[1]把高粱属分为 5 个亚属，即*Chaeotosorghum*、*Heterosorghum*、*Parasorghum*、*Stiposorghum*和*Sorghum*。高粱亚属（Section *sorghum*）又分为 3 个种，即*S. halepense* (L.) Pers. (2n=40)、*S. propinquum* (Kunth) Hitchcock（2n=20），*S. bicolor* (L.) Moench (2n=20)。*S. propinquum*为野生种，中文名为拟高粱。*S .bicolor* 为栽培种的高粱。甜高粱（*S. dochna*）（2n=20）是栽培高粱（*S. bicolor*）（2n=20）的一个变种，因其含糖量高而得名。拟高粱作为野生种质资源对高粱品种的改良具有重要意义，它与栽培高粱（*S. bicolor*）、甜高粱（*S. dochna*）染色体数均为 2n=20，它们之间杂交不存在遗传障碍。所以，对栽培高粱×拟高粱、甜高粱×拟高粱F_1减数分裂过程染色体形态、配对行为的观察，可为遗传学研究的可杂交性、杂种分析、染色体工程的研究等提供依据。

串联重复序列在植物基因组遗传研究中占据重要地位，rDNA是高度重复的序列，通常以几百乃至几千个拷贝成簇分布在染色体上[2]，45S rDNA是位于核仁组织区上的串联重复序列，每个重复单位依次编码 18S、5.8S、25S rRNA [3]。荧光原位杂交（Fluorescence *in situ* hybridization，FISH）技术是目前用于基因定位的最有效方法之一，而减数分裂研究不仅直接标示出减数分裂不同构型染色体的性质、来源，而且还使减数分裂染色体构型图像更清晰、立体感强[4]。本研究采用FISH技术将 45S rDNA在栽培高粱×拟高粱、甜高粱×拟高粱F_1（2n=20）的有丝分裂染色体（根尖细胞染色体）和减数分裂染色体（花粉母细胞染色体）上进行定位，追踪其随花粉母细胞减数分裂的行径，并为研究这两个杂种的染色体行为提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

实验用栽培高粱×拟高粱、甜高粱×拟高粱F_1实验材料由广西畜牧研究所李冬郁提供。

1.2 方法

1.2.1 染色体片的制备

根尖用0.002 mol/L 8-羟基喹啉于28℃处理3 h，水洗3次，0.075 mol/L KCl低渗处理30 min， 固定液（甲醇:冰醋酸＝3:1）固定，4℃保存，备用。花药幼穗用固定液（甲醇:冰醋酸＝3:1）在4℃下固定12~24 h后转移到70%的乙醇中保存。

有丝分裂染色体制片方法参照Song等[5]的方法。取根尖，水洗净后用2%纤维素酶和2%果胶酶按1:1混合，于28℃ 酶解2.5~3 h，吸去酶液，水洗3 次，去壁低渗火焰干燥法制片。减数分裂染色体制片：取花药，水洗净后用2%纤维素酶和2%果胶酶按1:1混合，于28℃ 酶解3~3.5 h，加固定液制成单细胞悬液，离心，洗涤，滴片法制片。

1.2.2 探针标记

45S rDNA被克隆在pUC18载体中，由美国Nebraska大学的Arumuganathan教授提供，用生物素-11-dUTP或地高辛-11-dUTP以缺刻平移法进行标记（华美生物工程公司）。

1.2.3 原位杂交与信号检测

参照韩永华等[3]方法，染色体制片在60℃烘片30 min。RNaseA（10 μg/mL，用2×SSC 稀释）在37℃处理1 h，2×SSC，75℃下处理5 min，70% 甲酰胺75℃处理3.5 min。于-20℃ 70%、95%、100% 乙醇中各处理5 min。加入40 μL 杂交液至染色体制片上，盖24mm×50 mm 的盖玻片，90℃共变性8～10 min，在37℃保湿皿中温育16～24 h。荧光信号检出程序包括以下步骤:杂交后的片子依次在2×SSC溶液、0.1× SSC溶液中各漂洗15 min；0.1% TritonX-100 室温下处理5 min；1×PBS 溶液室温下处理5 min；亲和素-CY3（Vector Laboraries）或抗地高辛的抗体－FITC（Vector Laboraries）37℃温育1 h；1×PBS 溶液室温下振荡处理3 次，每次5 min；每张制片加40 μL 含20%抗瘁灭剂（Vectashield，Vector Laboraries）的DAPI (4’6-diamidino-2-phenylindole) 复染(1 μg/mL DAPI溶于含20％抗猝灭剂的1×PBS中)；盖24 mm×50 mm的盖玻片；制片在Olympus BX51荧光显微镜下，红色、绿色、蓝色荧光分别用G、B、UV滤光片观察，利用DP70成像系统和DPController、DPManager软件合成照片。Photoshop 软件进行图片处理。

2 结果与分析

本研究中，染色体用DAPI复染，经UV激发在荧光显微镜下呈现蓝色荧光，染色体形态完好、构型清晰。用生物素-11-dUTP标记的45S rDNA，经亲和素-CY3检测后呈现红色荧光，与染色体背景的蓝色组合形成紫红色荧光。用地高辛-11-dUTP标记的45S rDNA，经抗地高辛的抗体-FITC检测后呈现绿色荧光，与染色体背景的蓝色组合形成淡蓝绿色荧光。

在有丝分裂中期染色体中，FISH检测的结果为栽培高粱和甜高粱有丝分裂中期染色体检测到2个杂交信号，分别位于2 条最长的染色体上(图1，A、C)；DAPI复染的结果显示该区域着色较浅，为第1号染色体次缢痕的位置(图1，B、D)。栽培高粱×拟高粱杂种F_1中期染色体检测到2个很长的杂交信号，被拉成细丝状，分别位于2条最长的染色体上(图1E)，而其他染色体已浓缩变短，这一结果表明45S rDNA在染色质变化周期中浓缩速度较慢，我们在各个亲本染色体中也观察到此现象(文章待发表)；DAPI染色结果显示该信号位点是次缢痕的位置(图1F)。在甜高粱×拟高粱杂种F_1的中期染色体中也检测到2个杂交信号，分别位于2 条最长的染色体上，杂交信号的强度略有不同(图1G)，DAPI 染色结果显示该信号位点为次缢痕的位置，且靠近着丝粒(图1H)。

在减数分裂染色体中，栽培高粱×拟高粱粗线期检测到1个杂交信号，位于1个二价体上（图2A），终变期二价体浓缩形成“八”字形、“O”形、棒形等，染色体数目清晰可计，平均构型为2n=2x=20(10

Ⅱ)，杂交信号位于1个二价体上（图2B）；中期Ⅰ DAPI 染色显示的10个二价体分散排列在赤道板上，染色体的蓝色荧光信号很强，杂交信号稳定地存在于一个二价体臂内靠近着丝粒的地方（图2C）；后期二价体中的两条同源染色体分开，分别移向两极，每极各有10条染色体，杂交信号也随着染色体分别移向两极（图2D）。甜高粱×拟高粱的信号位点与以上结果相同，粗线期同源染色体配对形成10个二价体，杂交信号位于其中1个二价体中部靠近着丝粒的地方（图2E）；终变期二价体浓缩形成“X”形，平均构型为2n=2x=20(10Ⅱ)，杂交信号位于1个二价体上（图2F）；中期Ⅰ10个二价体排列在赤道板上，45S rDNA清晰地定位在1 个二价体臂内（图2G）。后期Ⅰ同源染色体分开，未发现滞后染色体的异常现象，染色质也被DAPI染成蓝色，分布均匀，45S rDNA分别定位在两极的两条染色体臂内（图2H）。

上述研究结果表明这2个杂种减数分裂染色体配对行为正常，说明在有丝分裂中携带45S rDNA的染色体为同源染色体。

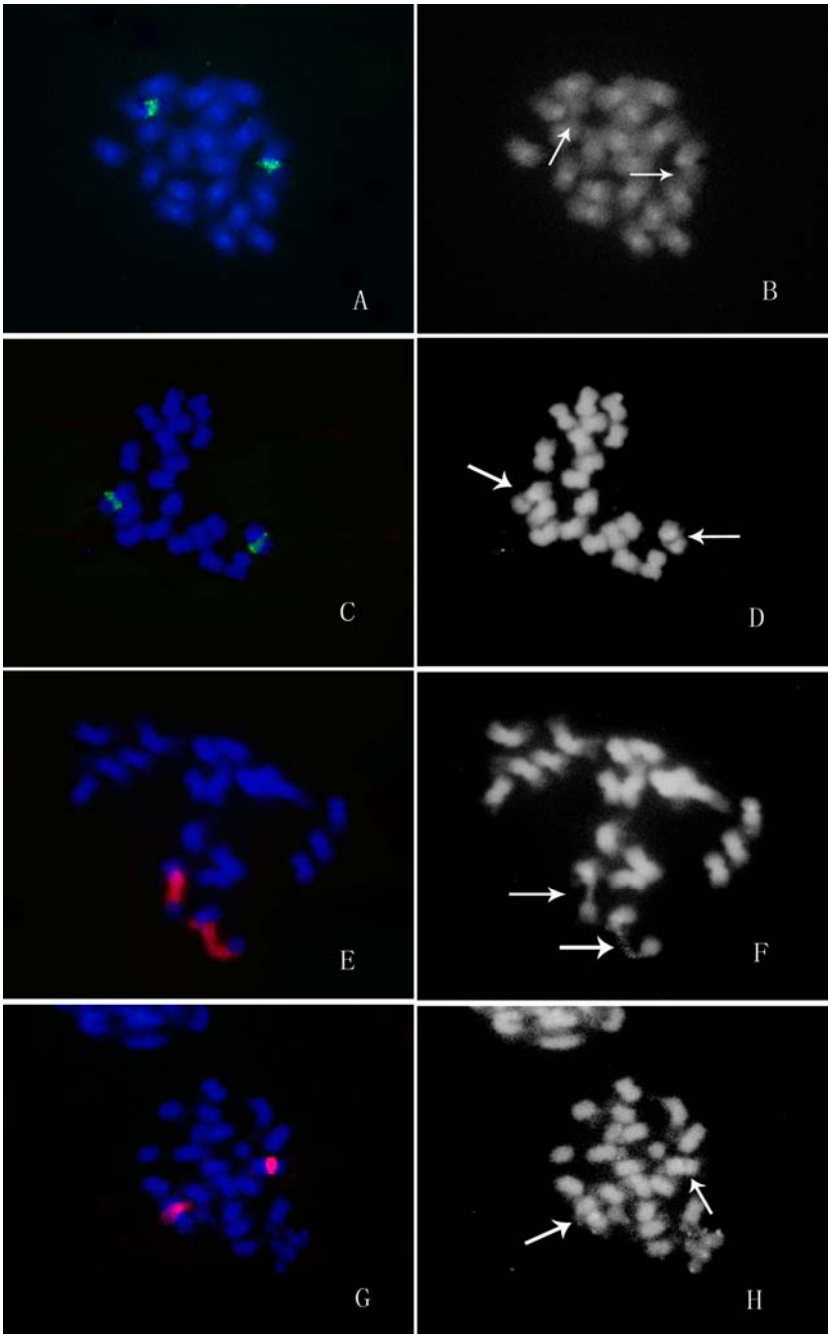

图1　45S rDNA在栽培高粱、甜高粱、栽培高粱×拟高粱、甜高粱×拟高粱有丝分裂染色体中的定位

A: 45S rDNA在栽培高粱中的定位；B:被DAPI染色的栽培高粱染色体灰度图（→:信号的位置，以下同）；C:45S rDNA在甜高粱中的定位；D:被DAPI染色的甜高粱染色体灰度图；E: 45S rDNA在栽培高粱×拟高粱中的定位；F:被DAPI染色的栽培高粱×拟高粱染色体灰度图；G:45S rDNA在甜高粱×拟高粱中的定位；H:被DAPI染色的甜高粱×拟高粱染色体灰度图。

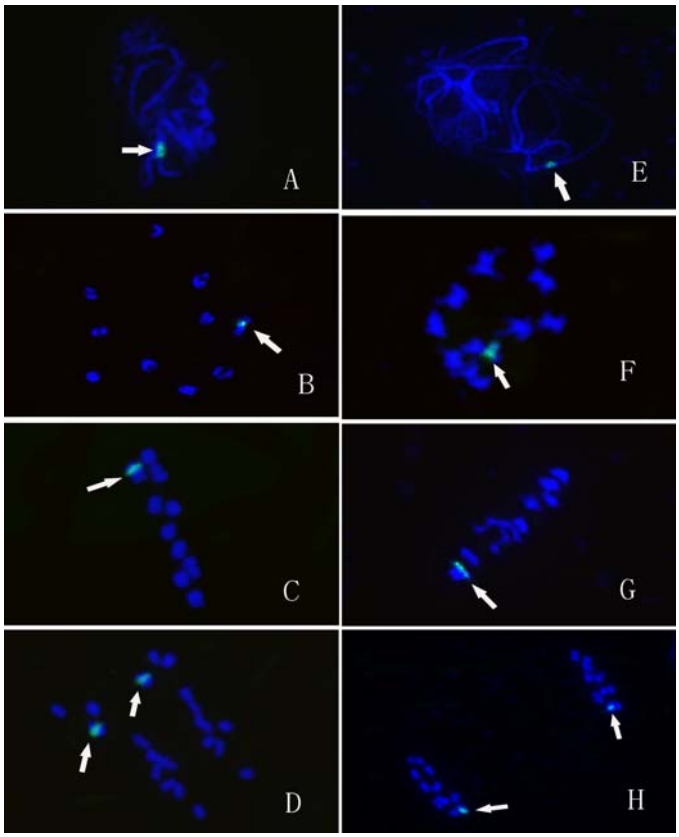

图2　45S rDNA在栽培高粱×拟高粱、甜高粱×拟高粱减数分裂染色体中的定位

A～D: 45S rDNA在栽培高粱×拟高粱减数分裂粗线期、终变期、中期Ⅰ、后期Ⅰ染色体中的定位（➡:杂交信号。以下同）；E～H: 45S rDNA在甜高粱×拟高粱减数分裂粗线期、终变期、中期Ⅰ、后期Ⅰ染色体中的定位。

3 讨 论

rRNA基因成簇分布在染色体的部位称rDNA位点，45S rDNA通常参与核仁的形成，故常常将45S rDNA位点称为核仁组织区（NOR），这一功能片段在有丝分裂细胞中多定位在随体染色体上或次缢痕中[6, 7]，也有些研究发现45S rDNA定位在着丝粒至短臂的区域或染色体长臂末端的局域，甚至出现杂交信号数目成奇数的情况[8]。Islam-Faridi[9]等利用BAC-FISH技术也证实栽培高粱NOR区位于第1号染色体上， 是个巨大的异染色质区。值得一提的是，Kim等[10]发现第1号染色体长度在有丝分裂过程中是变化的，因为NOR的重组在细胞增殖周期进程较慢，有时候观察到NOR覆盖整条染色体短臂，甚至延长至长臂的位置。由于对染色质结构重组引起NOR结构变化缺乏研究，只有结合对杂交种减数分裂染色体的研究才能进一步确定同属种质NOR区的位置关系。我们用杂种研究的结果证实栽培高粱、甜高粱、拟高粱NOR区都位于第1号染色体次缢痕上。

观察植物花粉母细胞减数分裂过程染色体配对行为在研究种属间亲缘关系、可育性、可杂交性、多倍体类型等方面起着重要作用。赵晓杰等[11]在研究雄性不育系高粱314A、13A 与3种苏丹草(*S.sudanense)*

（2n=20）杂交组合F_1代细胞遗传学等特性时，发现所有F_1代染色体均能正常配对。钟小仙等[12]利用苏丹草与拟高粱杂交，杂种F_1代花粉母细胞减数分裂中期染色体配对正常。Magoon等[13] 对10个优高粱（*Eu-sorghum*）杂交种的F_1的粗线期染色体研究发现杂种有的染色体配对行为正常，后代可育，有的却不育；染色体配对行为不正常的后代中有的可育，有部分不育，并筛选出优良的杂种后代。这些研究表明具有相同染色体数目的高粱属植物通过种间杂交可获得良好杂交后代。野生高粱作为一种种质资源对高粱的改良具有重要意义，因此对栽培高粱×拟高粱、甜高粱×拟高粱杂交后代遗传学研究非常有意义。我们用DAPI染色观察的两个杂种F_1染色体配对行为，发现终变期、中期Ⅰ染色体为10个二价体，平均构型为2n=2x=20(10Ⅱ)，未观察到单价体、多价体异常现象，减数分裂过程正常，说明亲本染色体同源性较高，杂种F_1可望获得优良性状。这为选育优良株系提供有用资料。

以DNA特异序列为细胞学标记的探针，追踪杂种后代染色体行为方面的文章已有较多报道[14, 15]。唐祈林等[4]采用多色基因组荧光原位杂交（Mc-GISH）技术分析玉米×四倍体多年生玉米杂种F_1不同的染色体构型，确定了不同构型染色体的来源。采用FISH技术，我们获得了45S rDNA序列随细胞减数分裂过程变化的行径，粗线期、终变期、中期Ⅰ都位于一对二价体上，后期Ⅰ平均分配到细胞两极，该技术达到类似同位素示踪的效果[16]，且克服了同位素的放射性污染、需要特殊防护措施及设备等的缺点。本研究从分子水平上证明这两个杂种减数分裂过程是正常的。

参考文献（References）：

［1］ de Wet JMJ，Huckabay JP. Origin of *Sorghum bicolor*. II. Distribution and domestication. *Evolution*，1967，21(4): 787–802.

[2] Pederson C，Laursen L. Chromosomal locations of fourminor rDNA loci and a maker microsatellite sequence in barley. *Chromosome Res*，1994，2(1): 65–71.

[3] HAN Yong-Hua，QI Cui -Ying，SHE Chao-Wen，LIU Li-Jia，SONG Yun-Chun. Physical mapping of 45S and 5SrDNA in *Coix lacryma-jobil*. *Acta Biol Exp Sin*，2003，36(5): 393–396.

[4] 唐祈林，荣廷昭，宋运淳. 玉米×四倍体多年生玉米F_1减数分裂构型及不同构型的染色体来源研究. 中国农业科学，2004，37(4): 473–476.

[5] Song YC，Gustafson JP. Physical location of fourteen RFL P markers in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor Appl Genet*，1995，90: 113–119.

[6] Gustafson JP，Dillé JE. The chromosome location of *Oryza sativa* recombination linkage group. *Proc Natl Acad Sci USA*，1992，89(18): 8646–8650.

[7] Xu J，Eerle ED. High resolution physical mapping of 45S (5.8S，18S and 25S) rDNA gene loci in the tomato genome using a combination of karyotyping and FISH of pachytene chromosome. *Chromosome*，1996，104(8): 545–550.

[8] Liu Bo，Chen Cheng-Bin，Li Xiu-Lan. Physical mapping of 45S rDNA on metaphase chromosomes in several plant species. *Acta Sci Nat Univ Nankaiensis*，2006，39(4): 96–102.

[9] Islam-Faridi MN， Childs KL， Klein PE， Hodnett G， Menz MA， Klein RR， Rooney WL， Mullet JE， Stelly DM， Price HJ. A molecular cytogenetic map of sorghum chromosome 1: Fluorescence *in situ* hybridization analysis with mapped bacterial artificial chromosomes.*Genetics*，2002，161(1): 345–353.

[10] Kim JS，Klein PE，Klein RR，Price HJ，Mullet JE，Stelly DM. Chromosome identification and nomenclature of *Sorghum bicolor*.*Genetics*，2005，169: 1169–1173.

[11]赵晓杰， 于卓， 刘永伟， 逯晓萍. 高粱314A、13A与苏丹草杂种F_1代的农艺特性及细胞学分析. 西北植物学报，2005，25(6): 1107–1113.

[12] 钟小仙，顾洪如，丁成龙，白淑娟，向阳海，刘朝晖. 苏丹草与拟高粱远缘杂交初报. 草地学报，2002，10(1): 24–27.

[13] Magoon ML，Shambulingappa KG. Cyto-morphological studies op some species and hybrids in the Eu-Sorghums. *Chromosoma*，1963，14: 572–588.

[14] Lim KB， Wennekes J， de Jong JH， Jacobsen E， van Tuyl JM. Karyotype analysis of *Liliulongifiorum* and *L. iliumrubellum* by chromosome banding and fluorescence *in situ* hybridisation. *Genome*，2001，44(5): 911–918.

[15] 熊志勇，高原，何光源，谷明光，郭乐群，宋运淳. 玉米、二倍体多年生类玉米及其杂交后代异染色质纽重复序列在染色体上的分布. 科学通报，2004，49(12): 1162–1165.

[16] 郭申生，任衍钢. 同位素示踪法与生命科学发展. 生物学通报，2006，41(9): 22–23.